

Efecto del VEGF sobre la vascularización, foliculogénesis y apoptosis en el ovario de ratonas

Dr. Ramiro Quintana^a, Dra. Laura Kopcow^a, Dr. Edgardo Young^a, Dr. Carlos Sueldo^a, Dr. Guillermo Marconi^a, Dra. Nidia Gómez Rueda^a, Dra Susana Vighi^a, Lic. Rosa Inés Barañao^b

a Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Buenos Aires, Argentina

b Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) CONICET, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este trabajo es investigar los efectos de la inyección ovárica directa de VEGF sobre el desarrollo de folículos antrales, la neoangiogénesis y la apoptosis.

Tipo de estudio: Estudio control de laboratorio.

Lugar del estudio: Centro de fertilidad afiliado a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Objetos de estudio: Ratonas Balb/c (n=32).

Intervención: Las ratonas fueron divididas en 4 grupos: Grupo control (C) n=6, Grupo sin tratamiento; Grupo con hiperestimulación (HS), n=8, los ovarios fueron hiperestimulados con 7.5 IU de PMSG y 10 IU de HCG; Grupo VEGF (V), n=8, se les realizó una inyección con 0.1 ml de VEGF (0.2 ug) en cada ovario; Grupo V+HS, n=8 se les realizó una inyección con VEGF y luego de 2 semanas se les realizó hiperestimulación ovárica.

Medición de resultado: número de folículos antrales y luteinizados, número de vasos y porcentaje de células Bcl-2 positivas.

Resultados: El número de folículos antrales en los grupos tratados con VEGF (V y V+HS) fue mayor que en C y HS (16.0 ± 2.5 vs. 6.0 ± 0.9 y 11.3 ± 0.6 respectivamente, $p < 0.005$). Todos los tratamientos incrementaron significativamente el número de vasos ($C 5.0 \pm 0.5$ vs. $V 20.0 \pm 4.8$, $p < 0.005$ y $V+HS 22.2 \pm 1.2$ $p < 0.01$) así como incrementaron el porcentaje de células positivas para Bcl-2 comparados con el grupo control ($C=0$, $V 11.8 \pm 3.5$ $p < 0.005$; $V+HS 12.5 \pm 3.7$ $p < 0.005$).

Conclusiones: nuestros hallazgos demuestran que la inyección directa de VEGF en el ovario de ratonas resulta en el desarrollo de una vascularización aumentada promoviendo un incremento del desarrollo folicular y una disminución de la apoptosis.

INTRODUCCIÓN

La regulación de la foliculogénesis en el ovario de los mamíferos es un proceso complejo. Las gonadotrofinas inducen el crecimiento folicular al mismo tiempo que ocurre un incremento en la vascularización folicular, sugiriendo que existiría un rol de la angiogénesis en el desarrollo folicular.

Según lo que surge de distintos estudios (1,2), uno de los principales candidatos a regular la formación de vasos sanguíneos en el ovario es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (3). El VEGF fue originalmente identificado por su capacidad específica de estimular la proliferación y migración de las células endoteliales de la microvasculatura, así como también por su efecto sobre la permeabilidad vascular (4,5). El VEGF es una glicoproteína heterodimérica de 34 Kda que tiene un importante rol en el proceso de desarrollo fetal y neonatal (6-8). Durante la vida adulta la neoangiogénesis entra en un periodo de quiescencia excepto en situaciones patológicas (como ser la hipoxia, la cicatrización, la artritis reumatoidea, o el crecimiento tumoral); también presenta actividad en procesos cíclicos y fisiológicos del sistema reproductivo femenino y es reconocido como esencial para el desarrollo folicular, para la ovulación, la luteinización, la menstruación, la implantación y el embarazo (9). El VEGF es producido por la mayoría de los tipos celulares y participa en el desarrollo de vasos sanguíneos de los folículos ubicados en la teca (10,11,12), actuando mediante dos receptores de la familia tirosina kinasa, llamados Flt-1 y flt-1/KDR (4,13).

Se ha descrito una relación inversa entre VEGF y apoptosis en el cáncer de pulmón y de páncreas así como en las células de la granulosa (14,15). De esta forma, el VEGF ha sido propuesto como un importante factor antiapoptótico.

Para investigar si la inducción de una mayor angiogénesis perifolicular con VEGF genera un desarrollo folicular y disminuye la apoptosis, hemos estudiado el efecto de la inyección directa de VEGF en el ovario de ratonas, seguida o no de hiperestimulación ovárica con gonadotrofinas para estimular el crecimiento folicular. También evaluamos el grado de vascularización mediante anticuerpos monoclonales anti CD34 de ratón, y la apoptosis en las células foliculares mediante la determinación de células B cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratonas:

Para la realización de los experimentos hemos utilizado un total de 32 ratonas Balb/c, de 8 semanas de edad, del Laboratorio de Animales del Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET, Argentina. El estudio fue realizado de acuerdo a las guías del National Institute of Health.

Las ratonas fueron divididas en 4 grupos: Grupo Control (C): Seis ratonas sin tratamiento alguno, Grupo Hyperestimulado (HS): Ocho ratonas estimuladas durante estrus con 7.5 IU de pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG). Estrus fue determinado mediante examen de la citología vaginal. Luego de 48 horas inyectamos 10 UI de hCG (ip). Dos horas más tarde las ratonas fueron sacrificadas. Grupo VEGF (V): Ocho ratonas fueron inyectadas con 0.1 ml de VEGF (Human recombinant Vascular Endothelial Factor, SIGMA, Saint Louis, MI, USA) (2 µg/ml) en cada ovario. La inyección del VEGF fue realizada directamente en la médula ovárica mediante una jeringa Hamilton Modelo 1710 LT (capacidad de 100 µl) e introduciendo la aguja (Aguja gauge 22s, Modelo 91038 Metal Hub), desde el polo distal del ovario. Quince días después de la inyección de VEGF las ratonas fueron sacrificadas. Finalmente, el Grupo V+HS: ocho ratonas fueron inyectadas con VEGF en cada ovario y 13 días después fueron tratadas como el grupo HS.

En cada grupo, los ovarios fueron removidos y fijados en una solución de paraformaldehído al 4%, luego inmersos en parafina y seccionados cada 2 µm para su evaluación posterior.

Número de folículos:

Las muestras de los ovarios fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Se clasificaron los distintos estadios foliculares según Salha y Abusheika (16). Se contabilizaron todos los folículos antrales y luteinizados en cada sección individual. Para evitar el conteo de un mismo folículo mas de una vez se evaluó sólo los folículos que contenían ovocitos con núcleo, y el tamaño de los

folículos que contenían ovocitos fue evaluado mediante visualización microscópica. El número de folículos fue contabilizado por campo en 10 observaciones en aumento de 250-x.

Elementos vasculares:

El conteo de elementos vasculares fue realizado mediante inmunohistoquímica, empleando anticuerpos monoclonales anti CD34 de ratón (Research Diagnostics Inc, Flanders NJ, USA), el cual es un antígeno específico de las células endoteliales y hematopoyéticas progenitoras de ratón. Como segundo anticuerpo utilizamos anticuerpos de conejo anti inmunoglobulinas de ratón. (DAKO Corporation, Carpinteria, CA., U.S.A) y el sistema de detección de la Histostain® Plus Kit (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA., U.S.A.) con DAB. Los resultados fueron expresados como la media del número de vasos teñidos contando 4 campos a una magnificación de 250-x.

Expresión del antígeno Bcl-2:

El Bcl-2 fue estudiado de las mismas muestras en parafina con el uso de métodos inmunohistoquímicos. Las secciones fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas mediante gradientes de alcohol, seguido de microondas en 0.01 M de buffer de citrato de sodio para la recolección de antígenos. La peroxidasa endógena fue bloqueada mediante un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual la unión específica fue bloqueada mediante incubación con suero normal de conejo. Las secciones de tejido fueron incubadas durante 60 minutos con anticuerpos monoclonales anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA., U.S.A.) a 37°C luego de la incubación durante 60 minutos con conjugado anti peroxidasa de ratón o anti-peroxidasa de conejo (DAKO Corporation, Carpinteria, CA., U.S.A); la unión fue visualizada mediante la incubación de las secciones con DAB y conteo con hematoxilina previo al montaje definitivo. Los nodos linfáticos fueron incluidos como controles positivos de Bcl-2. Como control negativo se utilizó una inmunoglobulina del mismo tipo y concentración de inmunoglobulinas que el anticuerpo primario. El control negativo mostró ausencia de tinción específica. Las células Bcl-2 fueron identificadas por la presencia de reactividad nuclear amarillada. La intensidad de la tinción de Bcl-2 fue evaluada en modo ciego por dos observadores independientes con una magnificación de 400-x. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células Bcl-2 positivas.

Análisis estadístico:

Las comparaciones estadísticas fueron realizadas mediante el test Student "t" y el test no paramétrico Anova Kruskal-Wallis, seguido de comparación múltiple de Dunn. Valores con $p \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Número de folículos:

La Figura 1 resume el número de folículos luteinizados y antrales en cada grupo:

El número de folículos antrales observados en los diferentes grupos fueron: C: 6.00 ± 0.93 , HS: 11.37 ± 0.65 , V: 16.00 ± 2.54 y V+HS: 14.75 ± 1.88 , y el número de folículos luteinizados observado fue: C: 2.00 ± 0.61 , HS: 3.13 ± 0.21 , V: 4.40 ± 0.96 y V+HS: 5.11 ± 0.94 .

El número de folículos antrales observado en las ratonas tratadas con VEGF fue significativamente mayor que en el grupo Control ($p < 0.05$), y que en el grupo HS ($p < 0.05$).

Cuando las ratonas fueron tratadas con VEGF y luego hiperestimuladas, el número de folículos antrales observado no difirió significativamente del grupo tratado sólo con VEGF (N.S.), sin embargo, el número de folículos luteinizados fue significativamente mayor que en el grupo Control ($p < 0.028$) (Figura 1).

Número de vasos:

La Figura 2 muestra el número de vasos en cada grupo. Todos los tratamientos incrementaron el número de vasos. Sin embargo, la mayor angiogénesis se observó en el grupo V+HS.

El número de vasos contado en cada grupo fue: C: 5.00 ± 0.55 , HS: 18.50 ± 2.11 , V: 20.00 ± 4.89 ($p < 0.05$ vs. C) y V+HS: 22.22 ± 1.23 ($p < 0.01$ vs. C).

Expresión de Bcl-2:

Dado que el Bcl-2 es una proteína antiapoptótica, hemos medido los porcentajes de células ováricas con expresión de esta proteína para cuantificar la inhibición de la apoptosis en cada grupo de ratonas (Figura 3). Ninguna célula fue positiva en el grupo control.

Hemos observado que las ratonas de los grupos HS, V y V+HS presentaron un incremento en el porcentaje de células positivas para Bcl-2. Los mayores valores fueron observados en los grupos V y V+HS.

Los valores obtenidos en cada grupo fueron: C: 0, HS 8.43 ± 1.85 , V: 11.8 ± 3.57 ($p < 0.05$ vs. C) y V+HS: 12.58 ± 3.75 ($p < 0.05$ vs. C).

DISCUSIÓN

La angiogénesis perifolicular está significativamente involucrada en el desarrollo folicular. Los folículos incrementan el número de células de la granulosa y adquieren una capa de células de la teca periférica en la que se forman nuevos vasos (neoangiogénesis) durante la transición de un folículo primario avascular y compacto a un folículo secundario vascularizado. Basados en estudios previos (12) que muestran que el VEGF juega un rol importante en la angiogénesis de la teca, realizamos la inyección in vivo de VEGF en el ovario de ratonas para mejorar la angiogénesis de la teca asociada al desarrollo folicular.

Nuestros resultados muestran que mediante el incremento de la vascularización, se puede inducir un mayor desarrollo folicular. La densidad vascular en estudios histológicos en ovarios tratados con VEGF fue significativamente mayor que en los ovarios de ratonas no tratadas. También se incrementó el número de folículos preovulatorios en ovarios tratados con VEGF. Nuestros datos sugieren que la regulación de la angiogénesis perifolicular durante el desarrollo folicular es un factor importante en el desarrollo de folículos ovulatorios.

El VEGF podría incrementar el número de folículos preantrales en el ovario de ratonas mediante distintos mecanismos; tal vez una mayor vascularización y/o una mayor permeabilidad vascular cerca de los folículos en desarrollo podría incrementar la llegada de factores endocrinos o paracrinós, como ser factores de crecimiento, esteroides, gonadotrofinas o, en forma más general, oxígeno y nutrientes para los folículos en desarrollo. Este incremento en la llegada de sustancias foliculotróficas podría resultar en una mayor tasa de reclutamiento folicular del pool de folículos primordiales (incremento del crecimiento folicular), o en una inhibición de la atresia folicular. Alternativamente, evidencias recientes sugieren que el VEGF podría tener efectos mitogénicos sobre las células de la granulosa in Vitro, y que podría estimular directamente el crecimiento folicular en el ovario de la rata (17).

En concordancia con nuestros hallazgos, Shimizu et al (18) publicaron recientemente un estudio sobre la inyección directa en el ovario de cerdos de fragmentos del gen del VEGF, y concluyeron que el número de folículos preovulatorios y la densidad capilar de la teca interna se incrementan significativamente luego de la inyección de fragmentos del gen del VEGF y posterior tratamiento con gonadotrofina coriónica equina (eCG), comparados con aquéllos tratados solamente con eCG. Mas allá de los resultados similares de nuestro estudio, existe una diferencia en relación al período de tiempo entre la inyección de VEGF (o de fragmentos del gen) y la toma de biopsias para el estudio. Nosotros hemos elegido

realizar la biopsia luego de dos semanas de inyectado el VEGF, basándonos en estudios previos que muestran desarrollo vascular en ratones luego de este período de tiempo (19) y para mejorar el efecto del VEGF sobre la vascularización, minimizando el efecto que pueda ejercer en forma directa sobre la permeabilidad vascular, mientras que Shimizu realizó las biopsias luego de sólo 7 días. Además nosotros estamos demostrando la efectividad de la proteína (Shimizu en cambio inyectó fragmentos del gen) y su relación con la apoptosis.

Recientemente Danforth publicó otro estudio en el cual investigó el efecto de la administración en la bursa de VEGF sobre el desarrollo de folículos preantrales en la rata (folículos primarios y secundarios), mostrando un incremento de folículos de forma dosis y tiempo dependiente (dentro de las 48-72 hs de administración). También demostraron que la administración de estrógeno incrementó la expresión de VEGF en el ovario de la rata (20).

Estudios funcionales sobre primates muestran mediante análisis histológico o mediciones hormonales, que la administración de sustancias que inactivan al VEGF bloquean el desarrollo y funciones de folículos preovulatorios (1,2,21). Esta inhibición del desarrollo folicular es causada por un cese en la angiogénesis y en la formación del antro.

La capacidad que presenta una vascularización adecuada de proveer señales endocrinas y paracrinas puede ser importante, tanto en estadios tempranos del crecimiento folicular como en estadios más tardíos de la selección y dominancia folicular.

Zimmermann et al demostraron en ratonas HX que la administración exógena de gonadotrofinas en presencia del Ac neutralizante de VEGFR-2 (con efecto antiangiogénico) no es capaz de conducir el desarrollo folicular al estadio preovulatorio. Esta inhibición del desarrollo folicular es causada por la detención de la angiogénesis folicular, y por una reducción de la formación antral (22).

En nuestro estudio se observa que el VEGF tiene un efecto similar a las gonadotrofinas sobre la angiogénesis y la foliculogénesis. Las gonadotrofinas conducen el desarrollo folicular, y parte de esta función depende de los efectos de las gonadotrofinas sobre la vascularización del ovario. Las gonadotrofinas incrementan la producción de VEGF y su secreción en las células epiteliales del folículo, que actúa de manera paracrina sobre el VEGFR-2 de las células endoteliales de la teca para inducir la angiogénesis (22). De esta manera se puede proponer que el VEGF es un importante intermediario de las gonadotrofinas para inducir la foliculogénesis.

Los resultados de nuestro estudio muestran que la inyección directa de VEGF en el ovario incrementa la vascularización, el número de folículos antrales y luteinizados, y disminuye la apoptosis en comparación con los controles. Cuando se compara HS y V se observa una tendencia del incremento de folículos luteinizados, de la vascularización, y una disminución de la apoptosis a favor de V (sin llegar a tener una diferencia estadísticamente significativa). El tratamiento con VEGF sí incrementa significativamente la respuesta ovárica (folículos antrales) en comparación con el grupo que recibió solamente la hiperestimulación ovárica.

Por otro lado, cuando se compara V y V+HE, no se observan diferencias significativas en el número de folículos antrales. Barboni (11) propuso que el VEGF podría tener un rol fundamental en el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas. Una de las hipótesis podría ser que la administración de VEGF reemplazaría el efecto final de las gonadotrofinas sobre la foliculogénesis. ¿Podría ésta ser la razón por la cual la administración de VEGF y la hiperestimulación no tuvieron un efecto sinérgico?

El incremento de la densidad vascular que rodea a los folículos favorece la inhibición de la atresia. Los folículos atrésicos tempranos pueden regenerarse cuando se los coloca en cultivo, sugiriendo que el folículo permanece en estado atrésico debido a una disminución en la vascularización que limita el acceso a nutrientes, sustratos y hormonas tróficas (23). Además del efecto del VEGF sobre la vascularización, nosotros proponemos que puede tener un efecto beneficioso sobre la apoptosis en el ovario (efecto antiapoptótico).

La muerte celular por apoptosis es un mecanismo por el cual se induce la atresia folicular (24). El VEGF reduce la apoptosis en células tumorales, mientras que la inhibición del VEGF con anticuerpos neutralizantes induce directamente la apoptosis en estas células (25). Por lo tanto, además del efecto del VEGF sobre la vascularización y la permeabilidad vascular, podría actuar como un factor que protege la sobrevivencia de las células de la granulosa e inhibe la atresia de folículos antrales, llevando a un incremento en el número de ovocitos ovulados.

En conclusión, nuestros hallazgos demuestran que la inyección directa de VEGF sobre el ovario de ratonas resulta en el desarrollo de una mayor vascularización, promueve el desarrollo folicular y disminuye la apoptosis.

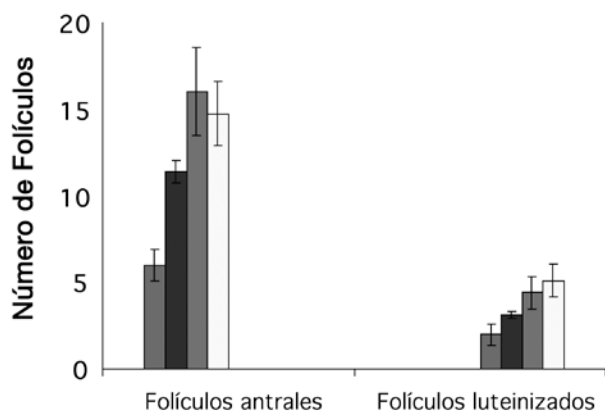


Figura 1.

Número de folículos antrales y luteinizados en los cuatro grupos. Los datos están mostrados como media±SD. ■ = Grupo Control. ■ = Grupo Hiperestimulado. ■ = Grupo tratado con VEGF. □ = grupo tratado con VEGF e hiperestimulación. *p<0.005 vs. C. **p<0.05 vs. C. ***p<0.05 vs. HS. ****p<0.01 vs. C. *****p=0.028 vs. C

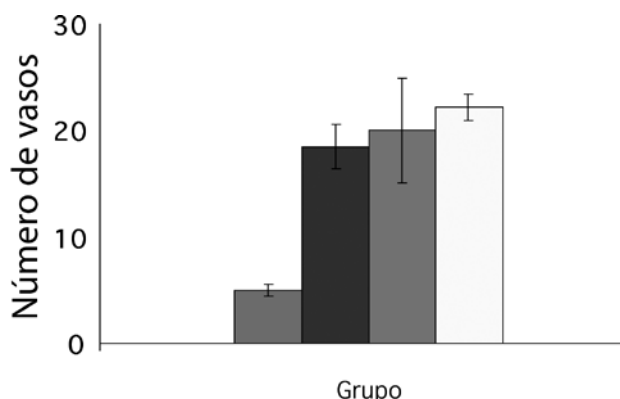


Figura 2.

Numero de vasos en los cuatro grupos. Los datos están mostrados como media±SD. ■ = Grupo Control. ■ = Grupo Hiperestimulado. ■ = Grupo tratado con VEGF. □ = grupo tratado con VEGF e hiperestimulación.. *p<0.05 vs. C. **p<0.01 vs. C.

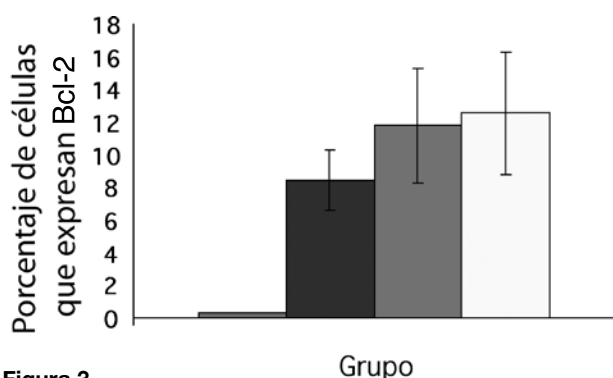


Figura 3.

Porcentaje de células con expresión de Bcl-2. Los datos están mostrados como media±SD. ■ = Grupo Control. ■ = Grupo Hiperestimulado. ■ = Grupo tratado con VEGF. □ = grupo tratado con VEGF e hiperestimulación.. *p<0.05 vs. C. **p<0.05 vs. C.

Referencias

1. Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 2001;142:3244-54
2. Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002;143:2797-807
3. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76
4. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25
5. Stacker SA, Achen MG. The vascular endothelial growth factor family: signaling for vascular development. *Growth Factors* 1999;17:1-11
6. Leung DW, Cachianes G, Kuang W, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9
7. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32
8. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39
9. Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Vascular endothelial growth factor in reproductive biology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:255-60
10. Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G, Berardinelli P, Scapolo PA. Follicle Activation Involves Vascular Endothelial Growth Factor Production and Increased Blood Vessel Extension. *Biol Reprod* 2001; 65:1014-9
11. Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol Reprod* 2000;63:858-64
12. Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E. Changes of mRNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod* 2002;67:1846-52
13. Shibuya M. Role of VEGF-Flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1995;67:281-316

14. Volm M, Mattern J, Koomagi R. Inverse correlation between apoptotic (Fas ligand, caspase-3) and angiogenic factors (VEGF, microvessel density) in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 1999;19:1669-71
15. Quintana R, Kopcow L, Marconi G, Sueldo C, Speranza G, Baranao RI. Relationship of ovarian stimulation response with vascular endothelial growth factor and degree of granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2001;16:1814-8
16. Salha O, Abusheika N, Sharma V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. *Hum. Reprod Update* 1998;4:816-32
17. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in the human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3845-51
18. Shimizu T, Jiang J-Y, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod* 2003;69:1388-93
19. Wei P, Li F. The effect of vascular endothelial cell growth factor on survival of skin flap in rats. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 1997 Nov;11:376-8.(Abstract)
20. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI. Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Preantral Follicle Growth in the Rat Ovary. *Biol Reprod* 2003;68:1736-41
21. McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG, Hughes FM Jr. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins. *Endocrinology* 2002;143:2905-12
22. Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *Clin Invest* 2003;112:659-9
23. Moor RM, Seemark RF. Cell signaling, permeability, and microvasculatory changes during antral follicle development in mammals. *J Dairy Sci* 1986;69:927-43
24. Guthrie HD, Grimes RW, Cooper BS, Hammond JM. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci* 1995;73:2834-44
25. Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-1 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;85:273-8